Über den Saponinnachweis in der Pflanze mit Blutgelatine

Von

Robert Fischer, Innsbruck

(Aus dem Pharmakognostischen Institut der Universität Innsbruck, Vorstand Prof. Dr. Ludwig Kofler)

(Vorgelegt in der Sitzung am 2. Mai 1930)

In einer früheren Mitteilung wurde auf die geringe Brauchbarkeit der bisher üblichen mikrochemischen Saponinreaktionen hingewiesen und zum exakten Nachweis von Saponin in der Pflanze die Methode der Blutgelatine beschrieben (Fischer [1]). Die damals angegebene Methode wurde nun in zweifacher Richtung wesentlich ausgebaut. Einerseits wurde der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Hämolyse genau berücksichtigt, anderseits die Entgiftbarkeit der Saponine durch Cholesterin mit herangezogen. Durch diese beiden Faktoren wird eine vollkommene Eindeutigkeit des Nachweises gewährleistet.

I. Methodik.

Die Herstellung der Gelatine erfolgt in der Weise, wie sie schon gelegentlich einer Mitteilung über den Nachweis von Solanin in der Kartoffel beschrieben wurde (Fischer und Thiele [2]). Gute Gelatine, am besten Marke »Gold«, löst man zu 6 bis 9% in einer *m*/30 Phosphatpufferlösung, die 0·7% Kochsalz enthält, unter Erwärmen auf. Man gibt sodann bei einer Temperatur von 35° C. pro 100 *g* Flüssigkeit zirka 2 *g* frisches Hühnereiweiß hinzu (oder die entsprechende Menge albumen ovi siccum gelöst in Wasser), kocht zirka eine halbe Stunde und filtriert heiß durch Watte.

Wird kein Wert auf eine vollkommen klare Gelatine gelegt, so wird nicht mit Eiweiß versetzt, sondern nach dem Sterilisieren der Gelatinelösung die noch heiß mit Watte verschlossenen Eprouvetten scharf zentrifugiert, so daß sich die beim Kochen und Sterilisieren ausgeschiedenen Flocken am Boden ansammeln. Der übrige Teil der Flüssigkeit ist dann meistens klar. Beim Verbrauch der Gelatine wird dann nur der jeweils oberste Teil der Eprouvette erwärmt und die flüssige Gelatine abgegossen, so daß der unten sitzende Niederschlag nicht in der Flüssigkeit verteilt wird. Die letzten 2 cm^3 Gelatine sind dann meist unbrauchbar. Diese Art der Zubereitung hat den Vorteil, daß die Gelatine, weil sie weniger erhitzt wurde, rascher erstarrt, als die mit Eiweiß geklärte. Es bereitet aber das Auffüllen der durch langes Aufheben eingetrock-

neten Gelatine mit Wasser (siehe weiter unten) Schwierigkeiten, da der Bodensatz wieder in der Flüssigkeit verteilt wird. Daher eignet sich diese Art der Bereitung mehr für Gelatine, die bald verwendet wird, während sich für Gelatine, die länger aufbewahrt wird, die Klärung mit Eiweiß als günstiger erweist. Das Eintrocknen der Gelatine, bedingt durch Verdunstung des Wassers, kann durch Aufheben in feuchter Kammer verhindert werden.

Zur Herstellung der Pufferlösungen verwendet man entweder primäres Kaliumphosphat und sekundäres Natriumphosphat (Sörensen) oder Mischungen von Phosphorsäure, primärem, sekundärem und tertiärem Natriumphosphat (Jarisch [3]). Durch entsprechende Mischung dieser Lösungen lassen sich alle gewünschten Wasserstoffionenkonzentrationen herstellen. Es hat sich hiebei als notwendig erwiesen, vier verschiedene Wasserstoffionenkonzentrationen zu verwenden, und zwar eine saure, eine fast neutrale und zwei im alkalischen Bereich. Bei der Wahl der beiden Extreme ist darauf zu achten, daß dieselben den Punkten der Laugen-, beziehungsweise der Säurehämolyse sich nicht zu stark nähern. Die von mir hergestellten Gelatinen besaßen eine $p_H = 6 \cdot 1, 7 \cdot 4, 8 \cdot 4$ und $10 \cdot 0$. Meist wird $p_H = 7 \cdot 4$ verwendet. Der Grund der Verwendung von vier Puffern wird später erwähnt. Bekanntlich reagiert jede Gelatine etwas sauer und vermehrt daher, in Lösung gebracht, die Azidität der Pufferlösung. Es empfiehlt sich daher, die Pufferlösungen von vornherein alkalischer herzustellen, als sie zum Schluß sein müssen. Es wird dann die mit Eiweiß geklärte Gelatinelösung durch Zugabe von Säure oder Lauge genau auf die gewünschte Wasserstoffionenkonzentration eingestellt und z. B. mit dem Folienkolorimeter nach Wulff kontrolliert. Bei Serienversuchen ist es angezeigt, die so eingestellte Gelatine in Eprouvetten zu füllen, mit Watte zu verschließen und durch Sterilisation im strömenden Wasserdampf (etwa 20 Minuten) haltbar zu machen. Durch unnötig langes Erhitzen wird die Erstarrungsfähigkeit der Gelatine vermindert. Ein durch zu langes Aufheben der sterilisierten Eprouvetten bedingtes Eintrocknen der Gelatine ist belanglos, man muß eben mit destilliertem Wasser (nicht mit Puffer!) auf das ursprüngliche Volumen auffüllen. Bezüglich der Gelatinekonzentration wäre noch zu erwähnen, daß es vorteilhaft ist, im Sommer eine etwas höhere (zirka $9^0/_0$), im Winter eine etwas niedere (zirka $6^0/_0$) Konzentration zu verwenden, um jeweils die gleiche Konsistenz zu erreichen. Es hat sich auch gezeigt, daß es meist vorteilhaft ist, für den Puffer $p_H = 10 \cdot 0$ mehr Gelatine zu verwenden, da diese Gelatinelösung meist schwerer erstarrt, und zwar $11^0/_0$, beziehungsweise $8^0/_0$.

Zum Versuch werden 3 bis 4 cm^3 Gelatine bei 35° verflüssigt, 2 bis 4 Tropfen defibriniertes Rinderblut zugesetzt, vermischt und die Eprouvette in kaltes Wasser gestellt. Man kann auch gewaschene Blutkörperchen verwenden (etwas größere Empfindlichkeit) oder andere Blutarten, um eventuell ein Blut zu finden, das gegenüber dem betreffenden Saponin besonders empfindlich ist.

Die Haltbarkeit des Blutes kann, was für die Praxis von Wichtigkeit ist, dadurch erhöht werden, daß man dasselbe in sterilisierten Gefäßen auffängt und aufhebt und die nötige Blutmenge mit einer sterilen Pipette entnimmt; das Blut bleibt dann zirka eine Woche auch ohne Eisschrank verwendbar. Das sterile Arbeiten ist entbehrlich, wenn man das Blut mit einem Konservierungsmittel wie Coffein natr. benz. (3%) (Hering [4]) versetzt.

Von der zu untersuchenden Pflanze oder Droge wird ein Schnitt oder ein Blattstück auf einen Objektträger gelegt und je nach Größe mit 1 bis 2 Tropfen halb erstarrter Blutgelatine bedeckt, ein Deckglas aufgesetzt, so daß die Blutgelatine den Schnitt möglichst gleichmäßig umgibt. Sodann wird der Objektträger sofort auf eine Kühlplatte gebracht, um die Gelatine schneller zum Erstarren zu bringen. Die Kühlplatte besteht aus einer von Leitungswasser durchflossenen, flachen Blechtrommel.

Man kann auch auf ein Deckglas einen Tropfen flüssige Gelatine bringen, das Deckglas umkehren und es mit dem hängenden Tropfen derart auf den auf dem Objektträger befindlichen Schnitt legen, daß derselbe ganz von der Gelatine umgeben ist. Entsprechend der Dicke des Schnittes muß natürlich eine größere oder kleinere Menge Gelatine aufgebracht werden, wenn der Schnitt, was unbedingt erforderlich ist, von allen Seiten mit Gelatine umgeben sein soll. Um nun die Erstarrung zu beschleunigen, wird der Objektträger sofort auf die Kühlplatte gebracht; oder man nimmt besser die ganze Manipulation auf der Kühlplatte vor.

Bei Anwesenheit von Saponin entsteht sofort oder nach einigen Minuten, manchmal erst nach Stunden, um das in der Blutgelatine befindliche Objekt ein durchsichtiger Hof, eine blutkörperchenfreie Zone, hervorgebracht durch das aus den Zellen herausgelöste und in die Gelatine diffundierende Saponin, welches auf seinem Wege alle erreichbaren in der Gelatine eingeschlossenen Blutkörperchen auflöst. Diesen hämolytischen Hof kann man mit freiem Auge und mit der Lupe beobachten; in manchen Fällen muß das Mikroskop verwendet werden. Bezüglich der zur Untersuchung verfertigten Schnitte muß noch folgendes berücksichtigt werden:

Die Schnitte müssen in erster Linie überall möglichst gleich dick sein und müssen zwecks Lokalisationsbestimmung so geführt sein, daß die zu untersuchenden Gewebeteile direkt mit der Blutgelatine in Berührung kommen. Z. B. wird ein Wurzel- oder Stengelquerschnitt halbiert, um so etwaige Unterschiede zwischen Rinde und Holz zu erkennen. Manchmal ist es nötig, einzelne Gewebe herauszupräparieren, wobei vorsichtig gearbeitet werden muß, um nicht saponinhaltigen Zellsaft mit saponinfreiem Gewebe in Berührung zu bringen und so Saponin an unrichtiger Stelle anzuzeigen. Besonders gilt dies beim Schneiden frischer Pflanzen. Bei Lokalisationsbestimmungen saponinreicher Drogen ist es vorteilhaft, den Schnitt mit bereits erstarrter Gelatine in Berührung zu bringen. Man klebt auf ein Deckglas ein erbsengroßes Stück Gelatine, bringt es auf

den am Objektträger befindlichen Schnitt und bewirkt durch leichten Druck auf das Deckglas, daß die Gelatine den Schnitt lückenlos umgibt und kühlt sofort. Bei hohem Saponingehalt wäre es nämlich möglich, daß durch die noch etwas flüssige Gelatine Saponin verschleppt wird. Eine Verzögerung der Hämolysewirkung kann auch durch Erhöhung der Gelatinekonzentration und des Blutzusatzes bewirkt werden.

Drogen oder getrocknete Pflanzen (Herbarexemplare) werden für gewöhnlich trocken geschnitten. Wenn nötig, darf man sie vorher auch kurze Zeit (1 bis 2 Stunden) in Wasser aufweichen, aber immer in ganzen Stücken, um ein Auslaugen des Saponins zu verhindern. Danach entfernt man das überschüssige Wasser mit Filterpapier (Hypotoniehämolyse) oder wässert von vornherein in physiologischer Kochsalzlösung.

Gemeinsam mit Johannes Thiele:

II. Berücksichtigung der Wasserstoffionenkonzentration.

Wie schon oben erwähnt, wurden bei der Herstellung der Gelatine vier verschiedene Puffer verwendet. Will man nämlich eine Pflanze auf Anwesenheit von Saponin untersuchen, so ist es durchaus nicht gleichgültig, bei welcher Wasserstoffionenkonzentration und mit welchem Puffer man arbeitet. Mit einer Gelatine $p_H = 6 \cdot 1$ wird man z. B. das Solanin in der Kartoffel nicht nachweisen können (Fischer und Thiele [2]). Hingegen kann man bei $p_H = 10 \cdot 0$ nach kurzer Zeit Hämolyse feststellen. Es ergibt sich daher die Regel, jede Pflanze gleichzeitig mit allen vier Puffern zu untersuchen um so das Wirkungsoptimum des betreffenden Saponins festzustellen.

In dem am stärksten wirkenden Puffer kann dann die weitere Untersuchung durchgeführt werden, wobei allerdings zu beachten ist, daß für Lokalisationsbestimmungen meist eine schwache Hämolysewirkung am günstigsten ist.

Es übt also die Wasserstoffionenkonzentration eine starke Wirkung auf die Saponinhämolyse aus. Darüber haben L. Kofler und Z. Làzàr [5] berichtet. Sie stellen von den Saponinen zwei Typen auf:

Typus I mit schwächerer Hämolysewirkung zwischen $p_H = 7 \cdot 4$ und $p_H = 8 \cdot 4$ und beiderseitigem Anstieg der Wirkung nach der sauren und alkalischen Seite.

Typus II mit sehr geringer Hämolysewirkung bei $p_H = 10 \cdot 0$ unmittelbar vor beginnender Laugenhämolyse und sehr raschem Anstieg nach der sauren Seite. Die meisten bekannten Saponine lassen sich nach diesen Typen einteilen. Das Solanin jedoch, das von vielen zu den Saponinen gezählt wird, verhält sich gerade entgegengesetzt wie Typus II: geringe Hämolyse bei $p_H = 6 \cdot 1$, äußerst starke bei $p_H = 10 \cdot 0$. Man kann also für das Solanin einen dritten Typus

annehmen (Fischer und Thiele [4]). Bei Bestimmung des Typus wird mit reinen Substanzen gearbeitet und die Hämolyse in vitro angesetzt.

Mit Hilfe der Blutgelatine kann aber der Typus des Saponins erschlossen werden ohne Darstellung des Saponins und unter Verwendung geringster Pflanzenmengen. Man legt hiebei vier Schnitte der zu untersuchenden Pflanze zu gleicher Zeit in die vier verschiedenen Puffer. Die Schnitte müssen natürlich alle gleich dick sein und von gleichem Pflanzengewebe stammen. Man beobachtet dann die Zeit, die verstreicht, bis sich ein gerade sichtbarer Hof zeigt. Aus dem Vergleich der erhaltenen Zeiten kann auf die Stärke der Hämolysewirkung in den einzelnen Puffern und auf den Saponingehalt geschlossen werden.

Unter Berücksichtigung der Löslichkeitsverhältnisse der Saponine zeigt sich nun eine weitgehende Übereinstimmung zwischen dem Hämolyseversuch in vitro und dem Versuch in Blutgelatine. Es ist also hiemit die Möglichkeit gegeben, die Eigenschaften eines Saponins vorherzusagen nur aus einem kleinen Stückchen Pflanze. Um aber zu beweisen, daß die Vorhersage auch wirklich stimmt, wurden einige Saponinpflanzen, aus denen bereits das Saponin rein gewonnen wurde, in der Blutgelatine unter Anwendung aller vier Puffer untersucht und das Ergebnis mit dem Verlauf der Hämolyse in vitro verglichen.

Radix Saponariae zeigt bei $p_H = 7 \cdot 4$ und $8 \cdot 4$ schwache, bei $p_H = 10 \cdot 0$ und besonders bei $6 \cdot 1$ stärkere Hämolyse. Dieses Verhalten entspricht genau dem Typus I, welchen das Saponaria-Saponin auch wirklich aufweist.

Enthält die Droge aber viel Saponin, so kann beim Typus I der Fall eintreten, daß die Intensität der Hämolyse in allen drei Puffern gleich ist. Es wird dadurch die Unterscheidungsmöglichkeit vom Typus II nicht gehindert, weil dieser Typus auch beim Vorhandensein von viel Saponin einen deutlichen Unterschied zwischen saurer und alkalischer Reaktion ($p_H = 6 \cdot 1$ und $p_H = 10 \cdot 0$) erkennen läßt.

Bei den Spinatblättern ist ein jähes Absinken der Hämolysewirkung von $p_H = 6 \cdot 1$—$8 \cdot 1$ bemerkbar. Im Puffer $p_H = 10 \cdot 0$ ist überhaupt keine Hämolyse sichtbar. Das Saponin entspricht daher dem Typus II, ebenso wie das aus den Spinatblättern rein dargestellte Saponin. Gleich verhält sich *Radix Senegae* und das Senegin.

Die beiden obengenannten Saponine stellen neutrale, d. h. in saurem und alkalischem Medium leicht lösliche Saponine dar. Es spielt daher die Löslichkeit des Saponins bei der Beurteilung der Hämolyseintensität keine Rolle. Die folgenden Saponine stellen saure dar, die also nur in alkalischem Medium löslich sind. Es wird daher die Wirkungsäußerung in der Blutgelatine stark beeinflußt.

Das Blatt von *Primula veris* zeigt ein langsames Ansteigen der Hämolysewirkung von saurer zur alkalischen Reaktion. Dies ist nicht zu verwechseln mit dem später zu erwähnenden Solanin,

das ein sprunghaftes Wachsen der Hämolyse bei sinkender Wasserstoffionenkonzentration erkennen läßt. In vitro dagegen folgt das Saponin, die Primulasäure, dem Typus I. Das von der Regel abweichende Verhalten in der Blutgelatine läßt sich folgendermaßen erklären: In saurem Medium ist die Löslichkeit sehr gering. Es wird daher trotz hohem hämolytischem Index in der Blutgelatine nur ein kleiner Ausschlag erzielt. Im alkalischen Bereich hingegen addieren sich die gute Löslichkeit und Stärke der Hämolysewirkung, so daß der Effekt in der Gelatine merklich erhöht erscheint.

Beim Blatt von *Hedera helix* beobachtet man in der Blutgelatine ein ausgesprochenes Maximum in der Nähe von $p_H = 7 \cdot 4$—$8 \cdot 4$, ein rasches Abfallen gegen $6 \cdot 1$ und ein langsames Abfallen der Hämolysewirkung gegen $10 \cdot 0$. Der hämolytische Index in vitro hingegen fällt von $p_H = 6 \cdot 1$ (1 1,500.000) steil ab gegen $p_H = 10 \cdot 0$ (1 20.000), entspricht also genau dem Typus II. Das merkwürdige Verhalten des Saponins im Schnitt hängt mit der Schwerlöslichkeit desselben zusammen. Beim Ansetzen der Hämolyse in vitro wurde das Hederin in einigen Tropfen Alkohol gelöst und dann erst die wässerige Flüssigkeit zugegeben. Dadurch wurde das Hederin in Lösung gehalten. Im Puffer $p_H = 6 \cdot 1$ kann sich der sehr hohe Index in vitro wegen der Unlöslichkeit des Saponins in saurer Flüssigkeit nicht entsprechend auswirken. Die Hämolyse ist daher sehr gering. Die Reaktion von $p_H = 7 \cdot 4$ reicht schon aus, um das Saponin aus der Zelle zu lösen und es wird in der Blutgelatine eine sehr starke Hämolyse erzielt, obwohl der Index in vitro nur noch 270.000 beträgt. Das langsame Absinken der Hämolyse-Intensität nach $p_H = 10 \cdot 0$ ist leicht erklärlich, da trotz der leichten Löslichkeit des Saponins der hämolytische Index schließlich nur mehr noch 1 20.000 beträgt. Die Löslichkeit des Saponins der *Hedera* in Alkalien ist bedingt durch die Bildung eines löslichen Salzes.

Dasselbe Verhalten wie das Hederin zeigen auch noch andere Saponine, z. B. das Saponin der Futterrübe und das Sapindus-Saponin.

Wie vorstehende Ausführungen zeigen, ist es also möglich, mit Hilfe der Blutgelatine den Typus sowohl von sauren als auch von neutralen Saponinen einwandfrei zu bestimmen.

Es erübrigt sich nur noch, auf das Solanin hinzuweisen, das unter den Saponinen eine Sonderstellung einnimmt. Solaninhaltige Pflanzenteile lassen nämlich in der Blutgelatine ein starkes und unvermitteltes Ansteigen der Hämolysewirkung von saurer zu alkalischer Reaktion erkennen (R. Fischer und J. Thiele [2]). Dasselbe Verhalten zeigt die Hämolyseprobe in vitro (R. Fischer [6]). Der hämolytische Index, der bei $p_H = 5 \cdot 6$ ungefähr 100 beträgt, erreicht bei $p_H = 10 \cdot 0$ einen Wert von zirka 266.000. Man kann daher bei Untersuchung solaninhaltiger Pflanzen meist nur bei $p_H = 10 \cdot 0$ und $8 \cdot 4$ deutliche Hämolyse beobachten, in den beiden anderen Puffern sinkt die Hämolysewirkung unter die Erfassungsgrenze. Nur große Solaninmengen, wie sie z. B. in den Kartoffelschößlingen vorkommen,

vermögen auch in $p_H = 7 \cdot 4$ und $6 \cdot 1$ eine Wirkung zu äußern wobei im Puffer 10·0 Hämolyse sofort erscheint und der Hof enorm groß wird. Es läßt sich also das Solanin mit Leichtigkeit von den eigentlichen Saponinen unterscheiden, wenn bei der Untersuchung alle vier Puffer verwendet werden.

Ergänzend sei noch kurz auf das Verhalten der Saponine in der Pflanzenzelle hingewiesen. Die Hämolysewirkung eines in Blutgelatine befindlichen Gewebestückes wird nämlich nicht durch das Saponin der gesamten Zellen dieses Stückes hervorgerufen, sondern nur von den am Rand gelegenen eröffneten Zellen. Wie durch Wässerungsversuche festgestellt wurde, dialysiert das Saponin nur schwer durch die intakte Zellwand (Fischer [1]).

III. Entgiftung durch Cholesterin.

Im vorhergehenden Abschnitte wurde bei der Auswertung des Ergebnisses immer von der beobachteten Hämolyse auf die Anwesenheit des Saponins geschlossen. Es gibt aber im Pflanzenreich einzelne Stoffe, die keine Saponine sind, aber dennoch rote Blutkörperchen aufzulösen vermögen, z. B. die Agarizinsäure, manche Amine aus einzelnen Pilzen, ätherische Öle u. a. m. Die Hämolysewirkung der genannten Stoffe ist allerdings im Verhältnis zu der der Saponine sehr gering. Obwohl das Vorkommen dieser Stoffe genugsam bekannt ist, besteht doch die Möglichkeit einer Verwechslung mit den Saponinen. Es wurde zwar mancherorts diese Schwierigkeit allzustark hervorgehoben und die Möglichkeit des Schlusses Hämolyse-Saponin von vornherein negiert. Wie es sich aber aus den folgenden Untersuchungen ergeben hat, ist bei Beachtung gewisser Vorsichtsmaßregeln dieser Schluß vollkommen gerechtfertigt.

Um daher den Nachweis des Saponins ganz eindeutig zu gestalten, benutzte ich die bekannte Tatsache, daß die Hämolysewirkung von Saponinen durch Behandlung mit Cholesterin wieder aufgehoben wird. Es bildet sich ein hämolytisch unwirksames Saponin-Cholesterid. Da aber das Saponin durch die Bildung dieser Verbindung nicht verloren geht, sondern als unlöslicher Komplex bestehen bleibt, ist die Möglichkeit gegeben, diese Verbindung durch geeignete Behandlung zu sprengen und das Saponin wieder auf die Blutkörperchen einwirken zu lassen. Dadurch wurde bewiesen, daß das Verschwinden der Hämolyse nach Cholesterinbehandlung nicht auf einem Herauslösen des Saponins beruhte, sondern auf einer Bindung desselben. Das Wichtigste dabei ist aber, daß die Fähigkeit der Cholesterinbildung eben eine typische Eigenschaft der Saponine darstellt.

Auf Grund dieser beleuchteten Eigenschaften der Saponine wurde ein Verfahren ausgearbeitet, das einen vollkommen eindeutigen Nachweis des Saponins in der Pflanze, d. h. in wenigen Schnitten gewährleistet. Der Arbeitsgang ist hiebei folgender:

Schnitte durch pflanzliche Objekte werden in einer Lösung von Cholesterin in Äther, Alkohol oder in einer Mischung dieser gekocht, danach mit Äther gewaschen, dieser durch leichtes Erwärmen verjagt und in Blutgelatine eingelegt. Durch diese Behandlung würde vorhandenes Saponin in der Pflanzenzelle in hämolytisch unwirksames Saponincholesterid umgewandelt werden. Der Schnitt dürfte also in der Gelatine nicht mehr wirken, wenn die vorher beobachtete Hämolyse wirklich von Saponin herrührte, denn dieses müßte durch Cholesterin entgiftet worden sein. Gegen diese Art der Beweisführung könnte nur noch geltend gemacht werden, daß das Lösungsmittel des Cholesterins den hämolytisch wirkenden Stoff aus dem Schnitt herausgelöst und so eine Entgiftung vorgetäuscht hätte. Man kann aber die Eindeutigkeit des Nachweises noch erhöhen, indem man das Vorhandensein des Saponins als Saponincholesterid in der Pflanzenzelle beweist. Es läßt sich nämlich durch Behandeln des Schnittes mit Xylol in der Hitze das in der Zelle gebildete Cholesterid spalten. Das wieder frei werdende Cholesterin löst sich im Xylol und das Saponin bleibt in der Zelle zurück. Der hernach in Blutgelatine eingelegte Schnitt muß daher, falls es sich um Saponin handelt, wieder Hämolyse zeigen. Durch diesen Arbeitsgang wurde also bewiesen, daß in der untersuchten Pflanze eine hämolytisch wirksame, durch Cholesterin entgiftbare Substanz vorhanden war, deren Cholesterid mit Xylol spaltbar ist. Da nach den bisherigen Kenntnissen unter den Pflanzenstoffen nur Saponine solche Eigenschaften besitzen, ist die Eindeutigkeit des Nachweises eine vollkommene.

Besteht endlich Verdacht auf einen ätherlöslichen, hämolytisch wirkenden Stoff in der Pflanze, wird der Schnitt bereits vor der Cholesterinbehandlung mit Äther extrahiert. Diese Möglichkeit ist z. B. bei den ätherische Öle enthaltenden Pflanzen gegeben. Es wurden zwar schon einige solche in Blutgelatine geprüft, ohne daß aber eine Hämolyse beobachtet werden konnte.

Um nun eine genaue Vorschrift für die Entgiftung eines saponinhaltigen Pflanzenschnittes zu geben, wurde eine größere Anzahl von Versuchen mit verschiedenen Lösungsmitteln angestellt, welche zur Auflösung des Cholesterins dienten.

Als bestes Lösungsmittel erwies sich eine Mischung von gleichen Teilen Äther und absolutem Alkohol, die für die meisten Fälle als ausreichend gefunden wurde. Zum Versuch wird diese Mischung mit Cholesterin in der Hitze gesättigt und darin einige Schnitte der zu untersuchenden Pflanze gekocht. Die Kochdauer beträgt etwa $^1/_2$ bis $^3/_4$ Stunden, je nach der Größe des vorher beobachteten hämolytischen Hofes; die zum Entgiften verwendete Flüssigkeitsmenge darf keinesfalls zu groß gewählt werden, da sonst merkliche Mengen Saponin gelöst werden könnten. Für zirka 10 bis 15 mittelgroße Schnitte genügen 3 cm^3 Flüssigkeit, die am besten in eine Eprouvette mit aufgesesetztem kleinen Kühler gebracht wird. Die zu entgiftenden Schnitte müssen jedenfalls von der Flüssigkeit

bedeckt sein. Nach dieser Arbeitsvorschrift wurden unter anderen folgende Pflanzen entgiftet:

Primula obconica, Silene inflata, Silene nutans, Sarsaparilla (Honduras und Veracruz), *Convallaria maialis,* Senegawurzel, *Soldanella alpina, Verbascum phlomoides, Digitalis purpurea, Digitalis lanata, Solanum tuberosum, Solanum nigrum, Sambucus nigra.*

Es hat sich jedoch gezeigt, daß bei Pflanzen mit sehr hohem Saponingehalt die Kochdauer auf etwa zwei Stunden ausgedehnt werden muß, um eine Entgiftung zu erzielen. Um in diesem Falle Zeit zu sparen, ist es angezeigt, als Lösungsmittel für das Cholesterin $90^0/_0$ Alkohol zu verwenden, wobei zur Entgiftung eine Kochdauer von nur 40 bis 75 Minuten nötig ist. Bei dieser Art der Behandlung geht natürlich ein Teil des Saponins im Alkohol in Lösung und kann dadurch beim nachfolgenden Kochen mit Xylol nicht mehr regeneriert werden. Es bleibt aber trotzdem noch genügend Saponin übrig, das gebunden wird und nach der Xylolbehandlung wieder Hämolyse hervorruft. Auf diese Weise wurden folgende Pflanzen entgiftet: *Hedera helix, Saponaria officinalis, Primula officinalis*-Wurzel, *Aesculus hippocastanum, Sapindus*-Nüsse. Daß bei den genannten Pflanzen die Entgiftung mit Schwierigkeiten verbunden ist, läßt sich zum Teil auch dadurch erklären, daß die enthaltenen Saponine selbst in vitro mit Cholesterin keine Fällung geben. Daß sie aber doch Verbindungen eingehen, die allerdings stark dissoziiert und teilweise schon durch Äther sprengbar sind, ist einerseits durch die Entgiftbarkeit in Pflanzenschnitten, anderseits durch das Verhalten beim kapillaranalytischen Nachweis bewiesen (siehe Kofler, Fischer, Newesely [7]). Bei dieser Methode basiert nämlich der Nachweis auf der Bildung einer Verbindung des Saponins mit dem Cholesterin. Die Bindung der einzelnen Saponine an Sterine in vitro und im Kapillarstreifen wurde eingehend von Kofler und Raum [8] untersucht.

Die Feststellung, daß die genannten Saponine sich im Schnitt entgiften lassen (wenn auch mit Verlusten), steht scheinbar im Widerspruch mit der Tatsache, daß diese in vitro mit Cholesterin nicht fallen. Es wird vermutlich durch Behandeln des im Schnitt vorhandenen Saponins mit gesättigter Cholesterinlösung (Alkohol oder Ätheralkohol) die Dissoziation des Saponincholesterides in den genannten Lösungsmitteln zurückgedrängt und doch gewisse Mengen Cholesterid gebildet, das nach seiner Spaltung die Anwesenheit von Saponin erkennen läßt.

Bei Pflanzen mit sehr geringem Saponingehalt hat es sich als zweckmäßig erwiesen, statt Ätheralkohol Äther allein als Lösungsmittel für das Cholesterin zu verwenden. So z. B. Semen Myristicae, Herba Absinthii, Herba Violae, Herba Thymi, Cortex Guajaci, Folia Theae, schwach wirksame Digitalis und Sarsaparilla-Drogen. Die Kochdauer beträgt zirka 30 Minuten. Die Verwendung von Äther garantiert die Unlöslichkeit des Saponins und wäre an sich das beste Lösungsmittel für Cholesterin. Es ist jedoch bei etwas höherem Saponingehalt eine derart lange Kochdauer nötig, so daß es zweck-

mäßig erscheint, Äther-Cholesterin nur für ganz schwache Saponinpflanzen zu verwenden. Auch Azeton kann als Lösungsmittel dienen, nur muß man beachten, daß manche Saponine darin löslich sind, z. B. das Hederin und das Saponin aus *Soldanella alpina.*

Außer mit Cholesterin geben aber viele Saponine auch mit anderen Alkoholen wie Oktylalkohol und Anethol sowie mit Phenol Fällungen, beziehungsweise Verbindungen. Es wurde daher Anethol zu $25^0/_0$ in Alkohol gelöst und darin die Schnitte gekocht. Weitere Versuche in dieser Richtung ergaben die Unbrauchbarkeit des Anethols zur exakten Entgiftung, wiewohl eine gewisse Bindungsfähigkeit mit Saponinen festgestellt werden konnte.

Die nach der angegebenen Vorschrift behandelten Schnitte werden mit einer Federfahne aus der Cholesterinlösung geholt, ganz kurz in Äther gewaschen und nach Vertreiben desselben in Blutgelatine gelegt. Einer Federfahne bedient man sich, um das durch das Kochen brüchig gewordene Objekt intakt unter die Blutgelatine zu bringen. Es hat sich nämlich besonders bei saponinreichen Pflanzen gezeigt, daß ein bereits entgifteter Schnitt, von dem durch unvorsichtiges Anfassen mit der Pinzette ein Stückchen abgerissen war, nur eben an der Bruchstelle Hämolyse gab. Als Erklärung dieser Erscheinung kann folgendes angegeben werden: Durch das Behandeln mit Cholesterin wurde nicht das ganze im Schnitt vorhandene Saponin quantitativ in das Cholesterid umgewandelt. Vermutlich bildet sich über die in der Zelle vorhandenen Saponinklumpen nur ein feiner Überzug von Cholesterid, in seinem Innern hingegen findet sich noch unverändertes Saponin. In der Blutgelatine wirkt ein derartiger Saponinklumpen mit einem Überzug aus Cholesterid natürlich nicht. Wird aber durch unvorsichtige Behandlung des Schnittes eine Bruchstelle erzeugt, somit neue Zellen angerissen und Saponinschollen zerrieben, zerreißt der Cholesteridüberzug und ungebundenes Saponin liegt zutage und kann in der Blutgelatine wirken. Es ist deshalb eine vorsichtige Behandlung des Schnittes mit der Federfahne geboten. Durch Kochen mit $90^0/_0$ Alkohol-Cholesterin ist zwar meist eine durchgreifende Entgiftung möglich, es geht aber mit dem Alkohol Saponin in Lösung. Es bleibt daher diese Art der Entgiftung, wie wir oben gesehen haben, nur für die Pflanzen, welche sehr viel Saponin enthalten, übrig.

Bezüglich des Waschens der Schnitte in Äther (nach der Cholesterinbehandlung) muß noch erwähnt werden, daß es nicht zweckmäßig ist, die Schnitte lange in Äther liegen zu lassen. Es gibt nämlich Saponincholesteride, die durch längere Behandlung mit Äther schon in der Kälte teilweise gespalten werden. Es würden also die zu lange in Äther gelegenen Schnitte trotz Cholesterinbehandlung wieder Hämolyse zeigen und so zu Irrtümern Anlaß geben, da eben ein Teil des Saponins freigemacht ist. Der Zweck der Ätherbehandlung ist lediglich die Befreiung des Schnittes vom überschüssigen Cholesterin.

Nachdem man sich also überzeugt hat, daß der in Blutgelatine gebrachte Schnitt hämolytisch unwirksam ist (wobei man ihn vorsichtshalber etwas länger liegen läßt, als vorher zur Erkennung der Hämolyse gerade nötig war), wird an parallel behandelten Schnitten die Sprengung des Cholesterids versucht. Die Schnitte werden 1 bis 2 Stunden mit Xylol gekocht, wobei die verwendete Flüssigkeitsmenge möglichst klein gehalten wird. Am besten benutzt man eine Eprouvette mit einem zirka 30 *cm* langen Steigrohr und füllt so viel Xylol ein, daß die Objekte gerade davon bedeckt sind. Die Flüssigkeit braucht nicht lebhaft zu kochen, es genügt, wenn fortwährend kleine Bläschen aufsteigen. Nach beendigter Spaltung müssen die Schnitte mit Äther gewaschen werden, damit kein Xylol, das eventuell hämolytisch wirken könnte, darin zurückbleibt, dann der Äther vertrieben und dieselben mit Blutgelatine behandelt werden.

Ein positiver Ausfall ist für Saponin beweisend. Man kann aber öfters beobachten, daß die Hämolyse erst später eintritt als vorher beim unbehandelten Schnitt (also vor der Cholesterin-Xylolbehandlung). Es ist daher gerade hier nötig, die Beobachtungsdauer auf längere Zeit auszudehnen; hiezu empfiehlt sich die Verwendung der schon oben erwähnten Kühlplatte in Verbindung mit einer feuchten Kammer. Es wird einfach eine Glasglocke mit eingefettetem Rand auf die Kühlplatte gebracht, auf der sich die Objektträger samt einer Schale Wasser befinden. Diese Vorrichtung hat sich auch bei der Untersuchung von Pflanzen mit sehr geringem Saponingehalt gut bewährt, da auf diese Weise ein Eintrocknen der Gelatine und das damit verbundene Verderben der Blutkörperchen vermieden wird.

Daß nach der Xylolspaltung die Schnitte in der Blutgelatine länger beobachtet werden müssen, hat darin seinen Grund, daß die Hämolyse oft verspätet aufzutreten beginnt, der Hof jedoch schließlich nahezu die gleiche Größe zeigt wie vorher. Durch die vorausgegangene Behandlung wird dem Schnitt nämlich jede Feuchtigkeit entzogen, besonders dann, wenn vorher mit frischen Schnitten gearbeitet wurde. Es scheint also der Feuchtigkeitsgehalt des Objektes von großem Einfluß auf die Schnelligkeit des Hämolysebeginnes zu sein. Durch Vergleich getrockneter und frischer Schnitte wurde dann auch wirklich festgestellt, daß frische Schnitte meist rascher Hämolyse hervorriefen als trockene.

Es ist auch klar, daß das im Zellsaft gelöste Saponin viel rascher in die Gelatine hineindiffundieren kann; die trockenen Saponinklumpen müssen erst in der Gelatine gelöst werden. Waren jedoch die trockenen Objekte eine gewisse Zeit in der Gelatine gelegen, hatte sich der hämolytische Hof meist zu derselben Größe entwickelt wie vorher beim frischen Schnitt. Bei gleicher vorhandener Saponinmenge muß die Größe des schließlich erreichten Hofes gleich sein. Die Zeit, die seine Ausbildung erfordert, variiert also bei frischen und trockenen Objekten. Auf diese Tatsache werde ich noch später bei Besprechung der Serienuntersuchung zurückkommen. Hier bei der Untersuchung xylolbehandelter Schnitte muß für die geringere

Hämolysewirkung auch ein gewisser Verlust von Saponin, der oft nicht zu vermeiden ist, verantwortlich gemacht werden. Die Saponine sind zwar in Äther, Ätheralkohol und in Xylol praktisch unlöslich. Die Menge des in einem Schnitt vorhandenen Saponins ist aber im Verhältnis zur Flüssigkeit eine derart geringe, daß selbst eine spurenweise Löslichkeit sich merklich auswirken kann. Es sei daher an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, daß man mit möglichst geringen Flüssigkeitsmengen arbeiten muß.

Daß die hier gegebene Vorschrift bei der Untersuchung von Pflanzen auf Saponin wirklich nötig ist, um zu einem sicheren Resultat zu kommen und sich vor Verwechslungen mit anderen hämolytisch wirkenden Inhaltsstoffen zu schützen, zeigen folgende Beispiele:

Eine Anzahl von eßbaren und Giftpilzen wurden in Blutgelatine untersucht und einige davon als hämolytisch wirksam befunden. Dieselben ließen sich zwar mit Cholesterin entgiften, die Xylolsprengung hingegen ergab ein negatives Resultat. Die Hämolysewirkung war verschwunden. Es handelt sich also in diesem Falle nicht um Saponin, sondern vielleicht um andere hämolytisch wirkende Stoffe.

Ein zweites Beispiel liefert Lärchenschwamm, der die hämolytisch wirkende Agarizinsäure enthält. Die Hämolyse äußert sich infolge der Löslichkeit der Agarizinsäure in Alkalien nur im alkalischen Puffer. Die Entgiftung konnte nach der hier angegebenen Vorschrift nicht durchgeführt werden. Selbst nach dreistündigem Kochen mit 90% Alkoholcholesterin war immer noch Hämolyse sichtbar, daher keine Entgiftung eingetreten. Wie oben angegeben, sind aber bei den Saponinen im höchsten Falle dafür zwei Stunden nötig. Erst durch sechs- bis achtstündiges Kochen mit 90% Alkoholcholesterin konnte bei Agaricum ein Verschwinden der Hämolyse beobachtet werden, die nach Behandeln mit Xylol zu einem geringen Teile wiederkehrte.

IV. Anwendung der beschriebenen Methode.

Ist man vor die Aufgabe gestellt, eine ganze Pflanzenfamilie zu untersuchen, so muß man, um die zu verschiedenen Zeiten ausgeführten Untersuchungen miteinander vergleichen zu können, die beobachtete Hämolyse von zwei Gesichtspunkten aus werten:

Erstens stellt man die Zeit fest, die vom Einlegen des Schnittes in Blutgelatine bis zum Erscheinen der ersten Hämolysespuren verstreicht. Diese Zeit ist in der folgenden Tabelle angegeben.

Zweitens wertet man die Größe des hämolytischen Hofes eine bestimmte Zeit nach dem ersten Auftreten der Hämolyse und bezeichnet je nach seiner Größe die Hämolyse als sehr schwach, mittelstark, stark, sehr stark. Als Zeitintervall wurde bei stark wirkenden Drogen $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde, bei schwach wirkenden 1 bis 2 Stunden angenommen. Beim Vergleich von Schnitten, die von verschiedenen Pflanzen stammen, ist allerdings der Schluß von der

Stärke der Hämolysewirkung auf die Menge des Saponins nur dann berechtigt, wenn es sich um Saponine von gleicher Hämolysewirkung handelt. Unerläßlich ist diese Art der Betrachtung, wenn man frische und trockene Pflanzen oder zu verschiedenen Zeiten angestellte Untersuchungen miteinander vergleichen will. Nach diesen Gesichtspunkten wurde eine Anzahl von Caryophyllaceen untersucht. Bei den behandelnden Pflanzen handelt es sich zum Großteil um alte Herbarexemplare, von welchen oft nur kleinste Bruchstücke erhältlich waren, die anderen selbstgesammelten hatten ein Alter von zirka einem Jahr.[1] Bei der Auswahl der Pflanzen wurde besonders darauf Gewicht gelegt, eine möglichst große Anzahl von Gattungen zu behandeln, um dadurch einen Überblick über die ganze Familie zu gewinnen.

Gemeinsam mit Hubert Schropp.

Zeichenerklärung in der Tabelle:

Die Hämolyseintensität in dem betreffenden Pflanzenteil ist in der entsprechenden Rubrik mit horizontalen Strichen unter der die Wasserstoffionenkonzentration der Gelatine bezeichnenden Zahl angedeutet:

4 Striche sehr starke Hämolyse,
3
2 mittelstarke
1 Strich schwache
kein Strich sehr schwache Hämolyse.
Eine Null bezeichnet keine Hämolyse in allen vier Puffern.

Aus folgenden Tabellen (p. 334 bis 341) ist ersichtlich, daß die Saponine weit verbreitete Inhaltsstoffe in der Familie der Caryophyllaceen darstellen, wie die herausgegriffenen Gattungen zeigen. Die bei einigen Pflanzen durchgeführten Cholesterinversuche bestätigen die Eindeutigkeit des Saponinnachweises. Bezüglich der Typen wäre zu bemerken, daß beide in den Caryophyllaceen vorkommen. Der Typus I scheint vorzuherrschen.

Handelt es sich aber darum, alle Pflanzen einer einzigen Gattung zu untersuchen, von der einige Vertreter schon in der Weise, wie oben gezeigt, behandelt wurden, so ist es nicht nötig, ganz genau das Auftreten der Hämolyse zahlenmäßig zu erfassen wie vorher. Es genügt vielmehr, nur mit einem Puffer zu arbeiten und die Hämolyseintensität ungefähr zu schätzen, was nach einiger Übung leicht gelingt. Diese Arbeitsweise wird auch dann beobachtet, wenn man sich nur vergewissern will, ob überhaupt Saponin in der Pflanze vorhanden ist.

Wie in den Tabellen auf p. 342 bis 351 bewiesen wird, verhalten sich bezüglich des Vorhandenseins oder des Fehlens von Saponin die Arten einer Gattung in den meisten Fällen gleich.

---

[1] Das Herbarmaterial stammt aus dem Naturhistorischen Museum in Wien. Es sei auch an dieser Stelle Herrn Hofrat Keissler für sein großes Entgegenkommen bestens gedankt.

Carophyllaceen	Wurzel	Stamm	Blatt
Acanthophyllum squarrosum Boiss.		0	6·1 7·4 8·4 10·0 4^{h} 0 0 0
Achyronychia Parryi Hemsl.		6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten
Allochrusa versicolor Boiss.		0	6·1 7·4 8·4 10·0 35 Minuten
Alsine aizoides Boiss.	6·1 7·4 8·4 10·0 25 Minuten		6·1 7·4 8·4 10·0 25 Minuten
Alsine peploides (L.) Wahlenberg		0	6·1 7·4 8·4 10·0 30' 4^{h} 4^{h} 30''
Arenaria serpyllifolia L.	6·1 7·4 8·4 10·0 2 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 2 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 2 Minuten
Buffonia brachyphylla Boiss.		0	6·1 7·4 8·1 10·0 12^{h} 0 0 12^{h}
Colobanthus subulatus Hock. f.		0	
Cometes abyssinica R. Br.		0	0
Cucubalus baccifer L.			
Dianthus barbato-chinensis L.	6·1 7·4 8·4 10·0 10 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 10 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 3 Stunden
Dicheranthus plocamoides Weeb.		0	0
Drymaria cordata Willd.		0	0

Blüte			Frucht	Same
Kelch	Korolle	Staubgefäße		
6·1 7·4 8·4 10·0 40' 4^h 12^h 0	6·1 7·4 8·4 10·0 35' 40' 40' 40'	0		6·1 7·4 8·4 10·0 2' 5' 5' 5'
6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten				
0				
				6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten
6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten				6·1 7·4 8·4 10·0 1 Stunde
0			0	0
0				6·1 7·4 8·4 10·0 20 Minuten
6·1 7·4 8·4 10·0 10 Minuten			0	6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten
				6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten

Caryophyllaceen	Wurzel	Stamm	Blatt
Drypis spinosa L.		0	6·1 7·4 8·4 10·0 10h 0 0 16h
Gypsophila elegans Bieb.	6·1 7·4 8·4 10·0 8 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 3 Stunden	6·1 7·4 8·4 10·0 1 Stunde
Heliosperma chromodontum Rohrb. = *Silene chromodonta*			
Herniaria cinerea DC.			
Loeflingia hispanica L.		6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten	
Lyallia Kerguelensis Hook.		0	0
Lychnis coronaria (L.) Desr.			
Moehringia muscosa L.			
Moehringia trinervia Clairv.	6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten
Pterocoptis pyrenaica Berger		6·1 7·4 8·4 10·0 10 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 10 Minuten
Pteranthus echinatus Desf.		0	0
Pycnophyllum Lechlerianum Rohrb.			6·1 7·4 8·4 10·0 3 Stunden
Queria hispanica Löfl.		0	

Blüte			Frucht	Same
Kelch	Korolle	Staubgefäße		
0			0	
6·1 7·4 8·4 10·0 10 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 10 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 10 Minuten		0
				6·1 7·4 8·4 10·0 25 Minuten
				6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten
6·1 7·4 8·4 10·0 10 Minuten				
				6·1 7·4 8·4 10·0 15' 30' 30' 1h
				6·1 7·4 8·4 10·0 3 Minuten
6·1 7·4 8·4 10·0 15 Minuten				
0				0

Caryophyllaceen	Wurzel	Stamm	Blatt
Sagina nodosa (L.) Bartl.	6·1 7·4 8·4 10·0 15 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 20 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 20 Minuten
Sagina procumbens L.			
Sagina subulata (Sw.) Presl			
Saponaria officinalis L.	6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten	Wurzelholz 6·1 7·4 8·4 10·0 15 Minuten	
Schiedea Kaalae Wawra		0	0
Scleranthus annuus L.	6·1 7·4 8·4 10·0 2 Stunden	0	0
Silene densiflora Urv.			0
Silene coeli-rosa (L.) A. Br. = =*Viscaria cardinalis*			
Spergularia arvensis Cambess.	6·1 7·4 8·4 10·0 10 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 8 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten
Spergularia azorica Lebel.			
Sphaerocoma Aucheri Boiss.		6·1 7·4 8·4 10·0 10 Minuten	
Stipulicida setacea Michx.	0	0	0
Telephium Imperati L.		6·1 7·4 8·4 10·0 30' 40' 45' 0	6·1 7·4 8·4 10·0 30' 40' 45' 0

Blüte			Frucht	Same
Kelch	Korolle	Staubgefäße		
6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 20 Minuten			6·1 7·4 8·4 10·0 30 Minuten
				6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten
				6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten
0				
0	0			6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten
				6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten
				6·1 7·4 8·4 10·0 15 Minuten
				6·1 7·4 8·4 10·0 5 Minuten
			6·1 7·4 8·4 10·0 10 Minuten	
0				
			6·1 7·4 8·4 10·0 40' 40' 0 0	6·1 7·4 8·4 10·0 5' 5' 7' 8'

Caryophyllaceen	Wurzel	Stamm	Blatt
Tunica saxifraga (L.) Scop.	6·1 7·4 8·4 10·0 10 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 10 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 20 Minuten
Uebellinia abyssinica Hochst.			0
Vaccaria grandiflora Jaub. und Spach.	6·1 7·4 8·4 10·0 3 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 20 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 30 Minuten
Velezia rigida L.		0	

Gemeinsam mit Herta Newesely:

Die Hämolyseintensität wird mit Kreuzen bezeichnet, und zwar 5 Kreuze sehr stark, 4 stark, 3 mittelstark, 2 schwach und 1 Kreuz sehr schwach. Keine Hämolyse wird mit einer Null bezeichnet.

Aus der nachstehenden Übersicht (p. 342 bis 351) läßt sich folgendes deutlich erkennen:

1. Die untersuchten Gattungen der Caryophyllaceen zeigten in ihren Arten entweder durchgehend das Vorhandensein von Saponin oder dessen Abwesenheit.

   Eine Ausnahme bilden lediglich *Dianthus callizonus, Dianthus petraeus, Arenaria tetraquetra* und wenige *Alsine*-Arten, die frei von Saponin zu sein scheinen. Diese Unstimmigkeit mag vielleicht darauf zurückzuführen sein, daß von den als saponinfrei gefundenen Pflanzen nicht alle Teile zur Verfügung standen und untersucht wurden, denn gerade im nicht untersuchten Teil konnte Saponin vorhanden sein.

2. Bezüglich der Verteilung des Saponins in den einzelnen Pflanzenteilen verhalten sich die untersuchten Pflanzenteile verschieden. Bei einigen Pflanzen konnte in allen untersuchten Teilen Saponin nachgewiesen werden, bei anderen hingegen nur in einzelnen Teilen. Im letzteren Falle gewinnt man den Eindruck, daß die Samen häufiger und mehr Saponin enthalten als die übrigen Pflanzenteile. Auf die Samen folgen die Blüten.

Blüte			Frucht	Same
Kelch	Korolle	Staubgefäße		
6·1 7·4 8·4 10·0 10 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 10 Minuten	6·1 7·4 8·4 10·0 15 Minuten		6·1 7·4 8·4 10·0 4 Minuten
0			0	6·1 7·4 8·4 10·0 Minuten
6·1 7·4 8·4 10·0 30 Minuten		6·1 7·4 8·4 10·0 20 Minuten		6·1 7·4 8·4 10·0 3 Minuten
	0			6·1 7·4 8·4 10·0 15 Minuten

3. Es ist auffallend, daß im Samen sich hauptsächlich der Keimling durch Hämolysewirkung auszeichnet. Wenn sich im Nährgewebe aber dennoch Saponin nachweisen läßt, so gewöhnlich nur in geringerer Menge als im Keimling. Die Samenschale war mit Ausnahme von *Cucubalus baccifer* und *Saponaria multiflora alba* frei von Saponin.

Untersuchung einiger Solanaceen.

Im Anschluß daran sei noch über einige Solanaceen berichtet. Diese waren zum Teil schon vorher als saponinhaltig bezeichnet worden (Dominguez und Mitarbeiter). Da aber aus den Angaben der Autoren nicht ersichtlich ist, in welcher Weise sie das Saponin feststellen, so muß man annehmen, daß hiezu die Hämolyse in vitro Anwendung fand. Dabei würde natürlich Solanin, dessen Anwesenheit bei Solanaceen häufig ist, sich von den eigentlichen Saponinen nicht unterscheiden lassen. Durch die Untersuchung in Blutgelatine und mit Berücksichtigung der Wasserstoffionenkonzentration läßt sich diese Frage mit ziemlicher Sicherheit beantworten. Es wurden drei Gelatinen von $p_H = 6 \cdot 1$, $8 \cdot 4$ und $10 \cdot 0$ verwendet.

Pflanzenteile, die Hämolyse gaben, wurden als positiv, solche, die keine Hämolyse zeigten, als negativ bezeichnet. Die Zahlen geben die verwendeten p_H an. Aufstellung p. 350, 351, 352.

Caryophyllaceen	Wurzel			Stamm			Blatt
	Holz	Rinde	Mark	Holz	Rinde	Mark	
Arenaria caespitosa Phil. .							
graminifolia Arduin				0	0	0	0
grandiflora Coss. et Wilk.				0	0	0	0
lanceolata All.				††††	††††	††††	0
pungens Clem.							
purpurea Pers.				††††	††††	††††	††††
tetraquetra L.				0	0	0	0
Alsine corymbulosa Boiss.				0	0	0	†
fasciculata Wahlenberg	0	0	0	0	†	0	
globulosa C. A. Mey.				0	0	0	
juniperina Wahlenberg				0	0	0	†
laricifolia Crantz				0	0	0	
liniflora Vis.							††
pinifolia Fenzl							†††
procumbens Fenzl .	0	0	0	0	0	0	†
rostrata Fenzl . . .	0	0	0	0	0	0	
verna Wahlenberg	0	0	0	0	0	0	0
Buffonia tenuifolia L.	0	0	0	0	0	0	0
Cerastium alpinum (L.) . . .				0	0	0	0
Biebersteinii Dc.							
Boissieri Gren. .							

Blatt-epid.	Blüte				Frucht		Same			Anmerkung
	Kelch	Korolle	Fruchtk.	Staubg.	reif	unreif	Schale	Nähr-gew.	Keiml.	
							0	0	††††	
0	0	†††								
0	0	†††	††	0						
0	††††	†††††	†††††	†††††						
							0	0	†††††	
††††	††††	††††	†††	†††††						
0	0	0	0	0						
†										
	0				0		0	0	††††	
	0									
	†						0	0	0	
	0	0			0					
	†	0					0	0	0	
	0									
	0	0	0	0						
	0	0	0	0						Same †
	0	0	0	0			0	0	0	
							0	0	0	
							0	0	0	

Caryophyllaceen	Wurzel			Stamm			Blatt
	Holz	Rinde	Mark	Holz	Rinde	Mark	
Cerastium caespitosum Triana	0	0	0	0	0	0	0
glomeratum Thuill.	0	0	0	0	0	0	0
glutinosum obscurum	0	0	0	0	0	0	0
ovatum Schur.				0	0	0	0
pennsylvanicum Hornem.							
semidecandrum L.				0	0	0	0
tomentosum L. . .							
Cucubalus baccifer L. . .							
Dianthus alpestris Sternberg							
arenarius L.	††††	††††	0	†††	††††	0	††††
atrococcineus							
banaticus Heuff.							
barbatus L.				††	††	0	††
chinensis L. . .	††††	††††		0	†††	0	†††
callizonus Schott.	0	0		0	0	0	0
Carthusianorum L.	†	†		0	†	0	0
Caryophyllus L.							
graniticus Jord. .							
hybridus Schmidt							
Knappii Aschers				0	0	0	0
neglectus Loisel.							

Blatt-epid.	Blüte				Frucht		Same			Anmerkung
	Kelch	Korolle	Fruchtk.	Staubg.	reif	unreif	Schale	Nähr-gew.	Keiml.	
	0	0	0	0			0	0	0	
	0	0	0	0						
	0	0	0	0						
	0	0	0	0			0	0	0	
							0	0	0	
	0	0	0	0			0	0	0	
							0	0	0	
							†††††	††	††††	
							0	††	†††	
†††							0	0	††††	
							0	0	††††	
	0	††	†††	††			0	†††	††††	
0	†††	†††	††††	††††			0	0	††††	
††							0	0	††††	
0							0	0	0	
0	††††	††††	††††	††††			0	0	††††	
							0	0	††††	
							0	0	††††	
							0	†	††††	
0	0	††	†††	0			0	0	††††	
							0	0	††††	

Caryophyllaceen	Wurzel			Stamm			Blatt
	Holz	Rinde	Mark	Holz	Rinde	Mark	
Dianthus pelviformis Heuff.							
petraeus Waldst.				0	0	0	0
plumarius L.	††††	††††		††††	††††		††††
Sternbergii Sibth.				0	0	0	0
suavis Willd....							
subacaulis Vill.				0	0	0	0
silvestris Wulf.				0	0	0	†
Gypsophila cerastoides Don.				†††	†††††	†††	†††††
muralis L.							
paniculata L.							
repens L.							
scorzonerifolia Ser.	††††	†††††					†††
Stevenii.							0
transsylvanica Spreng.							
Heliosperma alpestre Reichb. = *Silene alpestris*	†††	†††		0	0	0	0
Lychnis calcedonica L.	††	††††		††††	††††	††††	††††
Coronaria Desr...	0	††					
Flos cuculi L. .	††††	††††		††††	††††	††††	††††
Flos Jovis Desr..				0	0	0	0
fulgens Fisch....				†††	††††	0	††††
grandiflora Jacq. .							

Blatt-epid.	Blüte				Frucht		Same			Anmerkung
	Kelch	Korolle	Fruchtk.	Staubg.	reif	unreif	Schale	Nähr-gew.	Keiml.	
	†††	††††	†††	††††			0	††	††††	Griffel ††††
0										
††††							0	0	†††	
0							0	0	††††	
							0	††	††††	
0	0	††††	††††	††††		††††				
†††	††	†††	††††	††††		††††	0	††	†††	
†††††	†††††	†††††	†††††	†††††		†††††	0	††	†††††	
							0	0	††††	
							0	†††	††††	
							0	††	†††	
0										
0	††	†††	††††	†††		††††				
							0	0	††††	
0	††	†††	††††	†††		††††	0	0	†††	
†							0	††	††	
	0	††††	††††							Nagel d. Korolle †††††
0	††††	††††	††††	††††						Same ††††
0	0	0	0	0						Same ††††
	†††	†††	†††	†††			0	0	††††	
							0	0	††††	

Caryophyllaceen	Wurzel			Stamm			Blatt
	Holz	Rinde	Mark	Holz	Rinde	Mark	
Malachium aquaticum Fries = *Stellaria aquatica*							
Melandrium album (Mill.) Garcke	†††	††††		0	†††		0
rubrum (Weig) Garcke	†††	††††		†††	††††	†††	††††
Paronychia serpyllifolia DC.				††	††††	††	†††
Saponaria bellidifolia Sm. .							
multiflora alba . .				††	†††	††	
ocymoides L. .	†††	††††		†††	††††	†††	†††††
Silene acaulis L. . . .							
Armeria L.	†††	††††		†††	†††		†††††
Asterias grandifolia Griseb.							
Bergeri .							
dichotoma Ehrh. . . .	0	†††			†††		††††
Fortunei Vis.							
inflata Sm.				††††	†††††		†††††
maritima With.	†††	††††		†††	†††		†††††
nutans L.	0	††††		†††	††††		†††††
orientalis Mill.							
pendula L.							
pseudo-Atocion Guss.	0	††††		†	†	0	††††
Reichenbachii Vis. .	0	0		0	0	0	0
reticulata Fenzl. . .	0	††††		0	0		0

Blatt-epid.	Blüte				Frucht		Same			Anmerkung
	Kelch	Korolle	Fruchtk.	Staubg.	reif	unreif	Schale	Nähr-gew.	Keiml.	
							0	0	0	
0	0	0	††	0						
0	††††	††††	††††							
†††										Häutige Nebenblätter 0
							0	0	††††	
							†††	†††	††††	
†††††	††††	††††	†††††	††††		†††††	0	††	†††††	Griffel ††††
										Same †††††
†††	††††	†††	††††	††††	††††		0	0	†††	Nagel d. Korolle †††††
							0	0	††††	
							0	0	††††	
0	†††	††	††††	0		†††	0	0	††††	Griffel †††
							0	0	††††	
0	††	†††	††††	†††		††††				
††							0	0	††††	
††	†††	†††	†††††	0						
							0	0	††††	
							0	0	†††	
†††	†††	††††	††††	0		††††	0	0	†††	Nagel d. Korolle 0
0	0	0	0	0			0	0	††††	
0	0	†††	††††	0			0	0	†††	Nagel d. Korolle ††††

Caryophyllaceen	Wurzel			Stamm			Blatt
	Holz	Rinde	Mark	Holz	Rinde	Mark	
Silene rupestris L.	††	††††		0	†		†
Saponaria Cav. = *glauca*	—	†††		††	††††		††††
Schafta Gmel.							
tatarica Pers.							
Zawadskii Herbich				0	0	0	†
Stellaria media Cyrill. . . .	0	0		0	0	0	0
uliginosa Murr. .				0	0	0	0
Viscaria alpina (L.) Don.							
candida							
coerulea . .							
Dunetti							
elegans picta							
„ *vulgaris* Röhl (= *Lychnis Viscaria* L.)	†††	††††		†††	†††		†††

Solanaceen.

1, *Acnistus arborescens* Schlecht.

Positiv: Same: stark, wenig ansteigend von $p_H = 6 \cdot 1$ nach $p_H = 10 \cdot 0$.

Negativ: Pericarp und Blüte.

2. *Acnistus cauliflorus* Schott.

Negativ: Blatt.
Stengel.
Blüte.
Fruchtknoten.

3. *Capsicum microcarpum* Cav.

Positiv: Same: sehr stark.
Blatt: mittelstark. In allen Puffern gleich.

Blatt-epid.	Blüte				Frucht		Same			Anmerkung
	Kelch	Korolle	Fruchtk.	Staubg.	reif	unreif	Schale	Nähr-gew.	Keiml.	
	†††	†††	†††	†††	†††		0	0	0	Griffel †††
††††	†††	††††	††††	†††			0	0	†††	Griffel †††
							0	0	††††	
							0	0	††††	
0	0	0	††	††			0	0	†††	
0	0	0	0	0	0		0	0	0	
0	0	0	0	0						
							0	0	††	
							0	††	†††	
							0	†††	0	
							††	††	††	
							0		†††	
	†††		†††			†††				Same ††††

Negativ: Stengel.
Pericarp.

4. *Cestrum Parquni* L'Hevit.

Positiv: Blatt und Blumenblätter: stark.
Stengel: sehr schwach.
Pericarp: schwach. In allen Puffern gleich.

Negativ: Same.

5. *Cestrum pseudoquinoa* Mart.

Positiv: Blatt: sehr stark. Etwas ansteigend von $p_H = 6 \cdot 1$ bis $p_H = 10 \cdot 0$.

Negativ: Stengel.
Blüte.

6. *Cestrum Sendtnerianum* Mart.

Positiv: Blatt: schwach. Etwas ansteigend von $p_H = 6 \cdot 1$ nach $p_H = 10 \cdot 0$.

Negativ: Blüte.

7. *Cestrum sessiliflorum* Schott.

Positiv: Blatt: sehr stark. In allen drei Puffern gleich.
Blüte:

8. *Solanum angustifolium* Lam.

Positiv: Blatt und Stengel: sehr stark. Im $p_H = 6 \cdot 1$ ansteigend nach $p_H = 10 \cdot 0$.

9. *Solanum bonariense* L.

Positiv: Blatt: schwach, ansteigend von $p_H = 6 \cdot 1$ nach $p_H = 10 \cdot 0$.

Negativ: Stengel.
Same.

10. *Solanum Capsicastrum* Link.

Positiv: Mesocarp: schwache Hämolyse in $p_H = 6 \cdot 1$.

Negativ: Blatt.
Exocarp.
Samenschale.
Endosperm.

11. *Solanum chenopodium* F. Muell.

Positiv: Pericarp: sehr schwach, etwas ansteigend nach $p_H = 10$ 0.

Negativ: Same.
Blatt.
Stengel.

12. *Solanum giganteum* Jacq.

Negativ: Blatt.
Stengel.
Pericarp.
Same.

13. *Solanum grandiflorum* Desf.

Negativ: Blatt.
Stengel.
Knospe.
Same.

Gleichzeitig wurden alle hämolytisch wirkenden Solanaceen mit Selen-Schwefelsäure geprüft. Bei keiner einzigen Pflanze konnte ein positives Resultat erzielt werden.

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist es also nicht wahrscheinlich, daß die untersuchten Solanaceen Solanin enthalten. Es ist zwar die Möglichkeit vorhanden, daß in diesen Pflanzen neben Saponin auch Solanin vorkommt. Das Saponin müßte aber dann einen Typus II haben, der imstande ist, die Hämolysewirkung von saurem Medium ungefähr auf das gleiche Niveau zu bringen, wie das Solanin im alkalischen. Viel wahrscheinlicher aber ist die Deutung, daß es sich hier nur um ein Saponin vom Typus I handelt, insbesondere wenn man den negativen Ausfall der Farbreaktion auf Solanin berücksichtigt.

Zusammenfassung.

Die bereits in einer früheren Arbeit zum Nachweise von Saponin in der Pflanze angegebene Methode der Blutgelatine wird weiter ausgebaut.

Im ersten Abschnitt wird ausführlich die Bereitung der Blutgelatine beschrieben. Es werden Gelatinen mit vier verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen hergestellt, und zwar $p_H = 6 \cdot 1$, $7 \cdot 4$, $8 \cdot 4$, $10 \cdot 0$. Ferner werden die zu befolgenden Vorsichtsmaßregeln bei der Herstellung von Schnitten durch Pflanzenteile zwecks Lokalisationsbestimmung und das Einlegen derselben in die Blutgelatine angegeben.

Im zweiten Abschnitt wird der Einfluß der p_H auf die Hämolyse berücksichtigt. Durch Verwendung von vier verschieden gepufferten Gelatinen ist es möglich, den Typus der Saponine zu erschließen, wenn man die Hämolyseintensität in den vier Puffern vergleicht. An Hand einiger Beispiele wird der Beweis erbracht, daß die Unterscheidung von Typus I und II sowohl bei einem sauren als auch bei einem neutralen Saponin möglich ist. Ebenso läßt sich das Solanin auf diese Weise von den eigentlichen Saponinen unterscheiden.

Zur sicheren Identifizierung wird die Entgiftbarkeit der Saponine durch Cholesterin benutzt. Durch Kochen eines Schnittes in Cholesterinlösung verschwindet die Hämolysewirkung; das Saponin wurde durch das Cholesterin in der Zelle gebunden und dadurch entgiftet. Mit siedendem Xylol läßt sich aber die Saponin-Cholesterinverbindung, die ja in der Zelle noch vorhanden ist, spalten, dadurch wird das Saponin wieder frei und kann, in Blutgelatine gebracht, wieder Hämolyse hervorrufen. Da aber die Entgiftbarkeit durch Cholesterin und die Spaltbarkeit des Cholesterids eine typische Eigenschaft der Saponine ist, erscheint dadurch die Unterscheidung von anderen hämolytisch wirkenden Stoffen möglich, wie an Hand zweier Beispiele bewiesen werden konnte.

Im vierten Abschnitt wird die Methode praktisch angewendet. Vorerst wird die genaue Ablesung und die Auswertung der Hämolyse erläutert und in dieser Weise eine Anzahl von Caryphyllaceen (37 verschiedene Gattungen) untersucht, um einen Überblick über

die Familie zu gewinnen. Es wird hiebei festgestellt, daß der Großteil der untersuchten Gattungen saponinhaltig ist und daß das Saponin meist dem Typus I entspricht. Da es aber nicht immer notwendig ist, die Ablesung so ausführlich durchzuführen, wurden in vereinfachter Weise weitere Caryophyllaceen untersucht, wobei von jeder Gattung möglichst viele Arten behandelt wurden. Aus der Aufstellung kann geschlossen werden, daß sich die Arten einer Gattung jeweils gleich verhalten. In den Samen findet sich das Saponin hauptsächlich im Keimling.

Einige untersuchte Solanaceen ließen nur die Anwesenheit von Saponin erkennen. Solanin konnte keines nachgewiesen werden.

Literatur.

1. R. Fischer, Pharm. Monatshefte, 9. I. (1928), Heft I. und Vortrag Hamburger Naturforscherversammlung 1928, Referat in Pharmaceut. Zeitung, 1928.

2. R. Fischer und J. Thiele, Österr. Botan. Zeitschr., *78*, 325 (1929), Heft 4.

3. A. Jarisch, Biochem. Zeitschr., *134*, 163 (1922).

4. K. Hering, Arch. d. Pharm. und Ber. d. Deutschen Pharm. Ges. 1930, p. 36, Heft 1.

5. L. Kofler und Z. L. Arch. d. Pharm. und Ber. d. Deutschen Pharm. Ges., *265*, 610 (1927).

6. R. Fischer, Biochem. Zeitschr., *209*, 319 (1929).

7. L. Kofler, R. Fischer und H. Newesely, Arch. d. Pharm. und Ber. d. Pharm. Ges. 1929, S. 685, Heft 9.

8. L. Kofler und H. Raum, Biochemische Zeitschr., *219*, 335 (1930).

9. I. A. Dominguez, I. F. Molfino und E. L. de Ganelli, Trabaios del Instituto de Botanica y Farmakologia de Buenos Aires No. 40 (1919).